

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Ústav pro životní prostředí

Studijní program: Ekologie a ochrana životního prostředí

Studijní obor: Ochrana životního prostředí



Bakalářská práce

## **Diverzita půdních mikroorganismů ve vztahu k biodegradaci polymerů**

Diversity of soil microbial communities in relation to biodegradation of polymers

Pavel Hušek

Školitel: Mgr. Kateřina Jandová, Ph.D.

Praha, Květen 2016

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 23. 5. 2016

.....

Pavel Hušek

## **Poděkování**

Především bych rád poděkoval své školitelce Mgr. Kateřině Jandové, Ph. D., za její čas během konzultací i mimo ně, obrovskou ochotu, cenné rady a přátelský přístup. Dále všem z laboratoře environmentální chemie za příjemné pracovní prostředí.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině za podporu, kterou mi při studiu poskytují.

## **Abstrakt**

Polymerní materiály nabyli ve 20. století obrovského významu a nahradili spoustu užívaných materiálů. S tím je ovšem spojený obrovský nárůst plastového odpadu, který se stal problémem a vyžaduje řešení. Jedním z možných řešení je výroba tzv. biodegradabilních plastů. Biodegradabilní plasty by v přírodě měli samovolně podléhat degradaci a nezvyšovat tak objem plastového odpadu. Nicméně jejich degradace je často pouze částečná a dynamika polymerní biodegradace není ještě zcela objasněná. V této práci se věnujeme biodegradabilitě polyuretanu v ekologicky relevantním prostředí polní půdy.

Text práce je rozdělen do dvou částí. Literární přehled se zabývá mechanismy biodegradace polymerních materiálů a metodám, které se nejčastěji používají pro charakteristiku mikrobiálních společenstev. Druhá část obsahuje vlastní laboratorní projekt, ve kterém se snažíme vyhodnotit vliv biodegradace polyuretanu na půdní společenstva. Předpokladem je, že se účastní především společenstva hub a bakterií a pomocí enzymaticky katalyzované hydrolýzy rozloží polyuretanovou pěnu.

**Klíčová slova:** Biodegradace, polyuretan, půda, mikrobiální společenstva, PLFA

## **Abstract**

Polymer materials have had a big impact on the industry in the 20<sup>th</sup> century and replaced a large amount of then used materials. Plastic waste, however, has subsequently become a big problem that needs a solution. One of the possible solutions is to produce biodegradable plastics, that should degrade in nature by themselves and therefore not increase the volume of plastic waste. Their degradation, however, is often only partial and the dynamics of polymer biodegradation in soil are not yet fully understood. In this thesis, we are investigating biodegradability of polyurethanes in field soil as it has high ecological relevance.

The text consists of two parts. The first part is literary research on mechanisms of biodegradation of polymer materials and methods which are commonly used for characterization of microbial communities. The second part is our own laboratory project that aims to evaluate the effect of biodegradation of polyurethane on soil microbial communities. We assume that mostly fungi and bacteria taxa will take part in the biodegradation and will use enzymatically catalyzed hydrolysis to degrade the polyurethane foam.

**Key words:** Biodegradation, polyurethane, soil, microbial communities, PLFA

# Obsah

<b>SEZNAM UŽÍVANÝCH ZKRATEK.....</b>	<b>7</b>
<b>1. ÚVOD.....</b>	<b>8</b>
<b>2. POLYMERY.....</b>	<b>9</b>
2.1. SYNTETICKÉ POLYMERY.....	9
2.2. BIO-PLASTY.....	10
2.3. POLYURETANY.....	12
<b>3. BIODEGRADACE POLYMERNÍCH MATERIÁLŮ .....</b>	<b>13</b>
3.1. FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ BIODEGRADABILITU PLASTŮ .....	15
3.2. MECHANICKÁ DEGRADACE .....	16
3.3. CHEMICKÁ DEGRADACE .....	16
3.4. ENZYMATICKÁ DEGRADACE .....	17
3.5. BIODEGRADACE POLYURETANU .....	17
<b>4. CHARAKTERISTIKA MIKROBIÁLNÍCH SPOLEČENSTEV.....</b>	<b>19</b>
4.1. CLPP .....	20
4.2. PCR.....	21
4.2.1 PCR-DGGE a PCR-TGGE.....	22
4.2.2 Použití metod DGGE a TGGE.....	23
4.3. PLFA .....	24
<b>5. ZNAČENÉ SUBSTRÁTY .....</b>	<b>26</b>
5.1. PŘÍSTUPY KE ZNAČENÍ .....	26
5.2. POUŽITÍ V PŮDNÍ EKOLOGII .....	26
<b>6. PRAKTICKÁ ČÁST.....</b>	<b>28</b>
6.1. CÍLE PRÁCE .....	28
6.2. MATERIÁLY.....	28
6.2.1 Půda.....	28
6.2.2 Testované materiály .....	29
6.3. METODY .....	29
6.3.1 Stanovení základních parametrů půdy .....	29
6.3.2 Stanovení fosfolipidových mastných kyselin.....	29
6.3.3 Poměr hub a bakterií .....	31
6.3.4 Stanovení esterázy.....	31
<b>7. VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>32</b>
7.1. CHARAKTERISTIKA PŮDY .....	32
7.2. PLFA .....	32
7.3. ESTERÁZA.....	36
<b>8. ZÁVĚR .....</b>	<b>37</b>
<b>LITERATURA .....</b>	<b>38</b>

## **Seznam užívaných zkratk**

CLPP – fyziologický profil společenstev

DGGE – denaturující gelová elektroforéza

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EU - Evropská unie

GC - guanin-cytosin

ITS – internal transcribed spacer

MDI – metyl difenyl diisokyanát

PBS - polybutylensukcinát

PCR – polymerázová řetězová reakce

PHA - polyhydroxyalkanoláty

PHB - polyhydroxybutyrát

PLA - kyselina polymléčná

PLFA – fosfolipidové mastné kyseliny

PUR - polyuretan

TGGE – teplotní gelová elektroforéza

UV – ultrafialové záření

## 1. Úvod

Syntetické polymery a zejména plasty jsou v současnosti jedním z nejvíce využívaných materiálů. Jsou využívány v různých podobách téměř v každém průmyslovém odvětví i každodenním životě a z toho plyne vysoké zastoupení v odpadovém toku (PlasticsEurope, 2015). Jedním z možných řešení tohoto problému je výroba plastů, které budou biodegradabilní. Jsou známy přírodní polymerní materiály, které jednak svými vlastnostmi jsou schopné zastoupit současně používané plasty a zároveň jsou bez problému biodegradabilní (Yukata, 2009). Nicméně u těchto materiálů je velký problém cena (Reddy et al., 2002), proto se pozornost obrátila k modifikaci současně používaných polymerů a snaze u nich docílit biodegradabilních vlastností. Buď použitím směsi biodegradabilních polymerů a konvenčních plastů nebo pomocí různých aditiv, které podporují štěpení polymeru např. vlivem UV záření (Arutchelvi et al., 2007).

Cílem práce je vytvořit základní přehled o metodách charakterizace mikrobiálních společenstev v půdě a popsat, jakým způsobem se mikroorganismy podílí na biodegradaci polymerních materiálů se zaměřením na polyuretany, jakožto jeden z nejpoužívanějších polymerů.

Praktická část se zabývá vlivem pěti měsíců trvající biodegradace lehké polyuretanové pěny v mikrokosmu s polní půdou na složení přítomného mikrobiálního společenstva. V další části práce se věnujeme stanovení enzymu esterázy, u které předpokládáme, že její aktivita bude přímo úměrná biodegradaci materiálu.



## **2. Polymery**

Polymery se skládají z tzv. monomerů, což jsou molekuly, které jsou schopné se vázat s dalšími molekulami a tvoří tak polymer. Proces, kterým k tomuto dochází, se jmenuje polymerizace (McMurry, 2004).

Základní rozdělení polymerů je na přírodní polymery a syntetické polymery. Přírodní polymery jsou na přírodní bázi a zahrnují obrovské množství látek jako škrob, guma, různé polysacharidy – celulóza, chitin, polypeptidy a další.

Syntetické polymery tvoří drtivou většinu používaných polymerů a vyrábí se v petrochemickém průmyslu z neobnovitelných zdrojů. Díky své vysoké odolnosti tvoří plastový odpad, který je v současnosti problémový. Proto je potřeba přijít s řešením problému s plastovými odpady a napodobení biodegradabilních vlastností přírodních polymerů je jedno z možných řešení (Shah et al., 2008; Pethrick, 2010, PlasticsEurope, 2015)

### **2.1. Syntetické polymery**

Syntetické polymery se začaly vyrábět koncem 19. století z v přírodě běžně se vyskytujících materiálů např. bavlny. První využití našly při výrobě filmů z nitrátu celulózy, ale největší rozkvět zažily až ve století dvacátém (Pethrick, 2010).

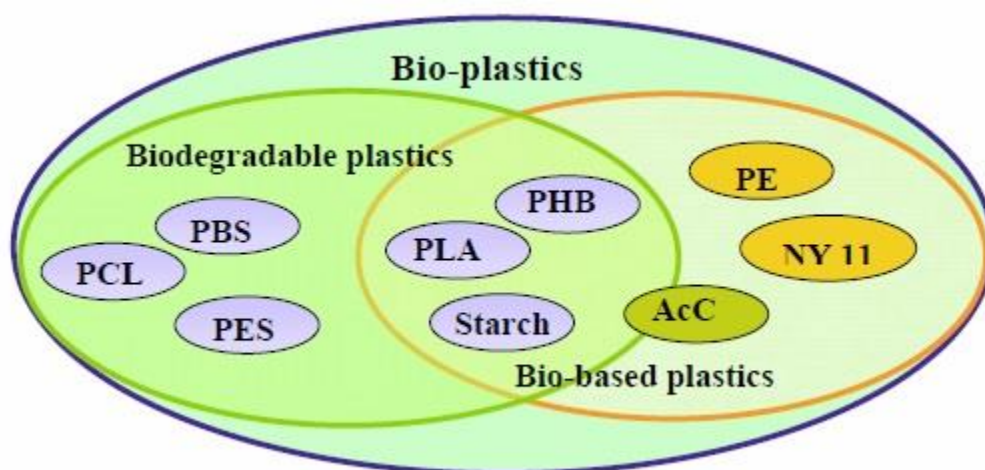
Ve 20. století nahradily plasty velké množství materiálů a jejich spotřeba stále roste. Je to především díky jejich velké rozmanitosti a výborným vlastnostem; odolávají bio- a abiotickým podmínkám, jsou lehké, odolné, dají se připravit na míru atd. (Shah et al., 2008). A právě schopnost si plasty připravit na míru dává možnost i pomocí pro-oxidantů a dalších aditiv načasovat rozpad polymeru. Ten se pak může tvářit jako degradovaný, ale ve skutečnosti pouze vznikají nebezpečné mikro-plasty (Artuchelvi et al., 2007).

**Tab. 1 – Vybrané polymerní materiály a jejich použití**

Triviální název	Chemický vzorec	Použití
Polyetylen	$\left[ \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \right]_n$	Plastové tašky, láhve, obaly na jídlo, potravinářská fólie, hračky
Polypropylen	$\left[ \text{CH}_2 - \underset{\text{CH}_3}{\text{CH}} \right]_n$	Plastové květináče, nárazníky u aut, šanony, injekční stříkačky, víčka od lahví
Polyvinylchlorid	$\left[ \text{CH}_2 - \underset{\text{Cl}}{\text{CH}} \right]_n$	Rámy do oken, holínky, pláštěnky, potahy na sedačky aut, zahradní hadice
Polystyren	$\left[ \text{CH}_2 - \underset{\text{C}_6\text{H}_5}{\text{CH}} \right]_n$	Obroučky u brýlí, kelímky, obaly na jogurty, laboratorní pomůcky
Polyethylentereftalát	$\left[ \text{O} - \text{C}(=\text{O}) - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{C}(=\text{O}) - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 \right]_n$	Plastové láhve na pití, obaly na maso, další obalové materiály
Polyuretan	$\left[ \text{R}^1 - \text{O} - \text{C}(=\text{O}) - \text{NH} - \text{R}^2 - \text{NH} - \text{C}(=\text{O}) - \text{O} \right]_n$	Stavební pěny, nátěry, matrace, čalounění, kuchyňské houbičky

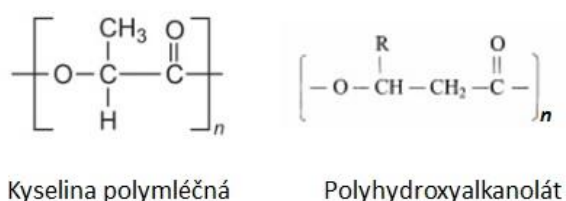
## 2.2. Bio-plasty

Bio-plasty je nepříliš šťastné označení pro veškeré plasty, které jsou buď biodegradabilní, nebo jsou z přírodních zdrojů. Označení bio-plast nám tedy nic neříká o biodegradabilitě a případné environmentální šetrnosti plastu (Yukata, 2009).



**Obr. 1 - Vybrané biodegradabilní a plasty z obnovitelných zdrojů (Yukata, 2009)**

Některé polymery např. polykaprolakton (PCL) nebo polybutylensukcinát (PBS) jsou z petrochemických zdrojů, ale jsou biodegradabilní. Naopak Nylon (NY11) je z obnovitelných zdrojů, ale biodegradabilní není. Z hlediska environmentální šetrnosti jsou tedy ideální materiály z obou těchto skupin tj. biodegradabilní a z přírodních zdrojů jako polyhydroxybutyrát (PHB) nebo kyselina polymléčná (PLA) (Yukata, 2009). Především kyselina polymléčná má dobré vlastnosti a např. v Itálii jsou již v oběhu láhve na vodu z tohoto polymeru (PackagingEurope, 2008).



**Obr. 2 – Chemické vzorce PLA a PHA**

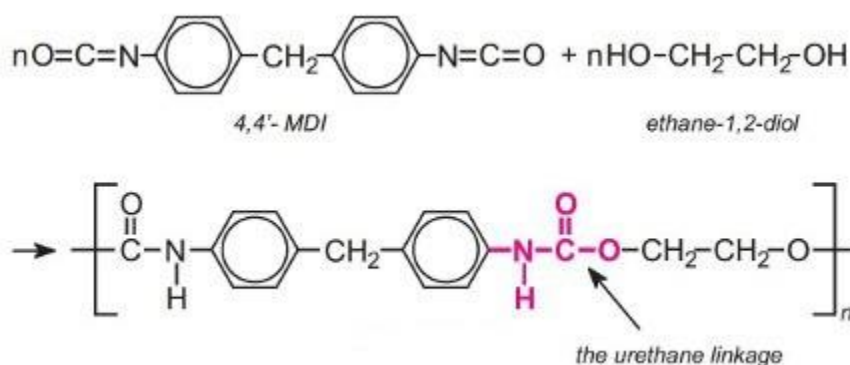
Kyselina polymléčná (PLA) je alifatický polyester, který je vyráběn z obnovitelných zdrojů a zároveň je biodegradabilní. V kombinaci s jeho vlastnostmi, které umožňují kontakt s potravinami tak tvoří alternativu v obalovém hospodářství. Výroba PLA z mléčné kyseliny je poměrně složitý proces, který může zahrnovat několik variant podle požadovaných konečných vlastností polymeru. Nejčastější a nejlevnější postup je kondenzační polymerace s přidavkem esterifikujících aditiv (Garlotta, 2002). Vzhledem k její nekompatibilitě s běžným recyklačním tokem má PLA pouze specifická využití. Hlavní uplatnění nachází v lékařství, protože se v těle rozpadá na

neškodnou kyselinu mléčnou a je proto vhodná pro dočasné implantáty apod. Dalším využitím mohou být mulčovací pytle a fólie (Lunt, 1998).

Polyhydroxyalkanoláty (PHA) jsou polyestery různých hydroxyalkanolátů. Ty syntetizují různé gram-negativní i gram-pozitivní bakterie, které tyto polymery uchovávají uvnitř svých buněk. Nejvíce prozkoumaný je rod *Pseudomonas*, kde hned několik druhů je schopno produkovat různé polyhydroxyalkanoláty, zejména pak PHB (Reddy et al., 2003). Podobně jako PLA jsou i polyhydroxyalkanoláty bez problému biodegradabilní a při jejich degradaci vzniká neškodná látka 3-hydroxybutyrát. Využití nachází opět v lékařství jako implantáty, případně v chemickém průmyslu jako prekurzory pro syntézu opticky aktivních sloučenin (Shah et al., 2008). Produkce PHA je ovšem velmi drahá proto jejich budoucnost závisí především na optimalizaci výrobních procesů (Reddy et al., 2003).

### 2.3. Polyuretany

Z chemického hlediska jsou polyuretany deriváty kyseliny uhličité. Uretany neboli karbamáty mají ke karbonylové skupině připojeny funkční skupiny amidovou a esterovou. Připravují se reakcí polyolu s polyisokyanátem (McMurry, 2004). Při reakci se polymer rozdělí na dvě hlavní části „tuhou“ a „měkkou“. Tuhá část je tvořena isokyanáty a vyznačuje se vysokou krystalinitou; měkkou část potom tvoří polyester příp. polyether. Mezi těmito segmenty je pak uretanová vazba, která vznikla reakcí isokyanátu a hydroxylové skupiny (Urgun-Demirtas et al., 2007).



**Obr. 3 - Reakční schéma výroby polyether PURu (Clements et al., 2010)**

Vlastnosti polyuretanů lze ovlivnit výběrem výchozích surovin – polyolů a polyisokyanátů nebo přidávkem různých aditiv. V současné době se využívá ve většině produkce polyetherpolyolů (Horák, 2012), což má negativní vliv na biodegradační vlastnosti (Darby and Kaplan 1968).

Díky jejich širokému rozpětí vlastností, které lze ještě volbou surovin modifikovat se z polyuretanů stal velmi poptávaný materiál – v současnosti jejich poptávka tvoří 7,4% z celkové výroby plastů v EU a dále se zvyšuje (PlasticsEurope, 2015). Tento trend odráží i jejich široké spektrum použití, kdy hlavně nahrazují dříve používané materiály. Třemi hlavními spotřebiteli polyuretanových materiálů jsou stavebnictví, automobilový průmysl a nábytkářství. Ve stavebnictví se používají jako konstrukční a izolační materiály případně jako potahy, postřiky. V automobilovém průmyslu nahradily latex a další materiály v interiérech, a používají se jako náplně sedaček, na čalounění, jako kryty na přístrojové desce, palubce apod. Podobné využití mají v podobě molitanů, matrací, čalounění atd. v průmyslu nábytkářském (Howard, 2002; Loredó-Treviño et al., 2012; PlasticsEurope, 2015)

### **3. Biodegradace polymerních materiálů**

Na začátek této kapitoly bych chtěl objasnit některé pojmy spojené s procesem degradace materiálů.

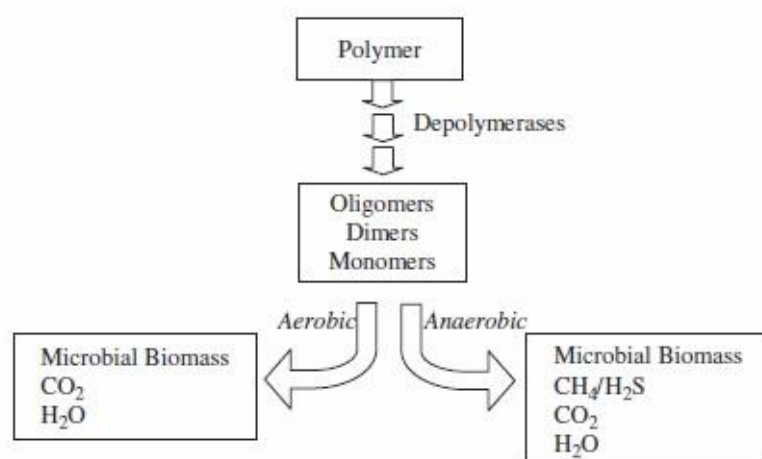
Degradace je všeobecné zhoršování vlastností materiálů, ale používá se i v přeneseném slova smyslu a můžeme pak hovořit např. o degradaci ekosystémů. Dekompozice je rozklad organických látek v přírodě, který může probíhat buď abioticky, nebo působením živých organismů. Dekompozice je pojem spojený převážně s degradací organické hmoty přírodního původu (listový opad, schránky zemřelých organismů apod.) (Vert et al., 2012).

Biodegradace je rozklad organických látek v přírodě způsobený pouze živými organismy a je častěji užívaný v souvislosti s degradací materiálů antropogenního původu (plasty, polutanty, apod.).

Mineralizace je proces přeměny organických látek na látky anorganické a bývá součástí různých procesů degradace. V případě polymerních materiálů se mluví o přeměně na CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O příp. CH<sub>4</sub> a další anorganické látky (Vert et al., 2012).

Degradace syntetických plastů v přírodě je pomalý proces, při kterém dochází ke změně v chemických nebo fyzikálních vlastností materiálu. Probíhá působením dvou hlavních faktorů: (1) působením vnějšího prostředí a (2) působením živých organismů - nejčastěji bakterií a hub. Během degradace se nejprve uplatňují abiotické vlivy a mechanická degradace a až v dalším kroku nastupuje degradace chemická a enzymatická. Obecně platí, že degradabilita materiálu závisí nejen na vlastnostech samotného materiálu, ale i na environmentálních podmínkách, kterým je vystaven (Gautam et al., 2007).

Živé organismy působí na polymerní materiály nejčastěji tak, že obrostou daný materiál a následně jej mechanicky, chemicky nebo enzymaticky degradují – využívají jej jako zdroj uhlíku pro svůj další růst (Bhardwaj et al., 2013). Biodegradace se účastní hned několik druhů organismů – bakterie, houby, řasy, prvoci aj. (Lucas et al., 2008) – které spolu mohou spolupracovat a vytvořit biofilm na povrchu materiálu, který je pak velmi účinný v další degradaci (Gu, 2007). Různé organismy se uplatní proto, že každá skupina pracuje s jinou částí polymeru – např. jedna skupina mikroorganismů rozbije polymer na monomery, další tyto monomery zpracuje na jednoduché látky a další tyto jednoduché látky již finálně mineralizuje (Loredo-Treviño et al., 2012).



**Obr. 4 - Základní schéma degradace polymerů a vzniklých produktů (Gu, 2007)**

### 3.1. Faktory ovlivňující biodegradabilitu plastů

Biodegradabilita plastů je závislá na několika jejich vlastnostech (Kaplan and Darby, 1968; Arutchelvi et al., 2008; Tokiwa et al., 2009):

#### 1. Hydrofilita

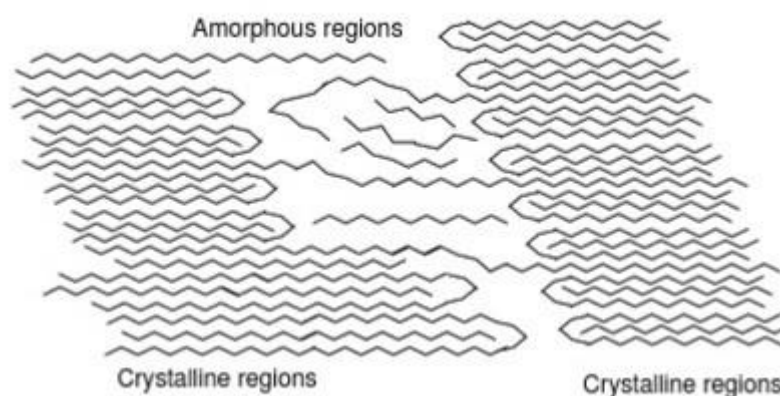
Souvisí se schopností mikroorganismů se přichytit a udržet na povrchu materiálu a tím přímo ovlivňuje, jak moc bude materiál vystavený degradaci.

#### 2. Velikost a molární hmotnost

Velikost polymerů je hlavní překážkou v degradaci materiálu, právě proto jsou počáteční reakce většinou depolymerizačního rázu.

#### 3. Krystalinita

Hraje významnou roli v degradabilitě materiálu. Pokud je materiál strukturně volnější, tedy více amorfní, je pro mikroorganismy mnohem přístupnější. Krystalinita závisí na pravidelnosti polymerního řetězce a uspořádání jednotlivých vláken polymeru; dále závisí na síle polymer-polymer interakcí (Pethrick, 2010)



**Obr. 5 - Schéma uspořádání polymerního řetězce. Regiony s vysokou krystalinitou a regiony amorfní (Pethrick, 2010)**

#### 4. Chemická struktura polymeru

Pokud je chemická struktura příliš složitě větvená a obsahuje málo funkčních skupin, je mnohem těžší ji degradovat. Materiál dosahuje větší degradace, pokud je za 1) co nejméně větvený a za 2) obsahuje velké množství snadno štěpitelných vazeb a skupin např. amidové, esterové aj.

## 5. Tvar a hustota

Materiál snáze podléhá degradaci ve formě fólie nebo pěny na rozdíl od pelet a jiných kompaktních tvarů.

## 6. Přidaná aditiva

Běžně se do plastů přidávají antioxidanty, ftaláty a jiné látky, které mohou zabraňovat degradaci nebo být toxické pro mikrobiální organismy.

### 3.2. Mechanická degradace

Mechanická degradace probíhá především díky environmentálním faktorům. Ty začínají materiál degradovat téměř okamžitě po jeho výrobě a na výrobku se to projeví např. změnou barvy, praskáním, ztrátou mechanických vlastností (Shah et al., 2008), nicméně i mikroorganismy mohou mechanicky působit nejčastěji prorůstáním pórů v materiálech, které postupně vyplňují a tvoří tak další praskliny a oslabují strukturu (Lucas et al., 2008). Další degradace je už pak svou povahou chemická nebo enzymatická (Beech et al., 2005).

### 3.3. Chemická degradace

Některé organismy (*Nitrosomonas sp.*, *Nitrobacter sp.*, *Thiobacillus sp.* aj.) mohou do svého okolí vypouštět agresivní chemické sloučeniny – organické i anorganické kyseliny a další látky, které se aktivně účastní degradace (Lucas et al., 2008).

Jiným způsobem chemické degradace je pokrytí polymerního materiálu vrstvou organismů a vytvořením tzv. biofilmu. Toto společenstvo mikroorganismů pak produkuje EPS (extracellular polymeric substances), které jsou tvořeny především polysacharidy, proteiny, nukleovými kyselinami a lipidy. Tento mix látek spolu s buněčnými bičíky, vlášením a dalšími buněčnými strukturami zajišťuje přilnutí k povrchu materiálu, kde se tak vytvoří vhodné prostředí pro další růst společenstva. Prostředí biofilmu má pro mikroorganismy řadu výhodných vlastností: slouží jako ochranná bariéra např. před UV zářením, zadržuje vodu, podporuje sorpci organických i anorganických látek a řadu dalších neméně důležitých aspektů (Flemming and Wingender, 2010).



Další chemická degradace má enzymatický charakter a jedná se především o reakce oxidační a hydrolytické. V obou případech dochází ke štěpení kovalentních vazeb a tvorbě radikálů, které pak dále štěpí polymer (Shah et al., 2008; Lucas et al., 2008).

### **3.4. Enzymatická degradace**

Chemicky jsou enzymy bílkoviny, které katalyzují biochemické reakce, tj. snižují jejich aktivační energii. Enzymy mají obrovskou diverzitu i specifitu a jako katalyzátory se uplatňují v řadě biochemických interakcí (Štípal et al., 1992). Enzymatická degradace plastových materiálů by se dala nazvat depolymerizací. Tento proces může probíhat dvěma typy reakcí: (1) Enzymatická hydrolýza, (2) Enzymatická oxidace.

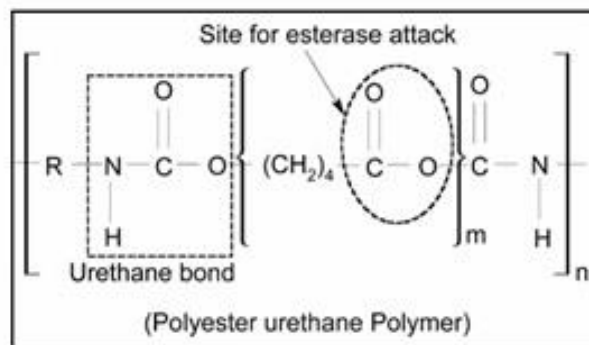
Enzymatická hydrolýza probíhá ve zkratce takto: extracelulární enzym mikroorganismu se naváže na substrát, a katalyzuje hydrolytické štěpení. Tím vzniknou jednodušší oligomery a monomery, které již mikroorganismy použijí jako zdroj uhlíku a energie.

Enzymatická oxidace probíhá, pokud je materiál těžko hydrolyzovatelný. Její zjednodušený průběh by se dal popsat následovně: enzym oxiduje atom kyslíku ze struktury materiálu na alkohol nebo peroxylovou skupinu, které jsou dále již snadno přístupné hydrolytickým enzymům. (Lucas et al., 2008; Bhardwaj et al., 2013).

### **3.5. Biodegradace polyuretanu**

Biodegradace polyuretanu je do velké míry závislá na chemickém složení, především výběru polyolu pro jeho syntézu. Velká část biodegradace závisí na enzymatickém štěpení polyolové části připraveného polymeru (Gautam et al., 2007).

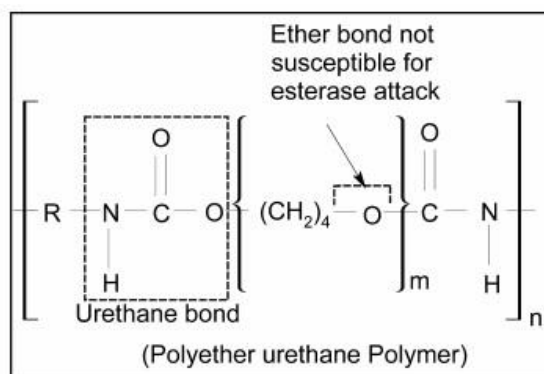
Pokud zvolíme polyesterpolyol, zlepšíme biodegradabilní vlastnosti, naopak PURy z polyetherpolyolů jsou velmi odolné vůči biologické degradaci (Darby and Kaplan, 1968).



**Obr. 6 - Molekula polyester PURu s vyznačeným místem účinku esterázy (Gautam, 2007)**

Biodegradace polyesterových PURů probíhá za pomoci enzymů hydrolýzou esterových vazeb. Tohoto procesu se účastní minimálně dva typy enzymů: extracelulární a intracelulární depolymerázy. Nicméně často s nimi působí další skupina enzymů – hydrolázy, nejčastěji esteráza a proteáza, které pomáhají s hydrolytickým štěpením (Loredo-Treviño et al., 2012).

Dalšími enzymy jsou tzv. polyuretanázy, kterým se intenzivně věnuje americký vědec Gary Howard a jeho tým. Jedná se o dva typy extracelulárních enzymů, které izoloval z bakterií *Pseudomonas fluorescens*, *P. chlororaphis*, *Acinetobacter sp.*, *Corynebacterium sp.*. Tyto enzymy mají dvě funkční části: jednu, která zprostředkuje adsorpci na hydrofobní povrch a druhou, která zprostředkuje hydrolýzu (Howard et al., 1999, 2002, 2012). Organismy, které se účastní biodegradace polyuretanů, jsou většinou zástupci hub. Nejspíše proto, že hyfy jim umožňují nejdříve proniknout do struktury materiálu a až pak začít s enzymatickou degradací (Mastumiya et al., 2010). Polyetherové polyuretany odolávají biodegradaci mnohem lépe. Aby docházelo k jejich degradaci, jsou nutné alespoň dvě methylenové skupiny (Kaplan and Darby, 1968).



**Obr. 7 - Molekula polyether PURu s vyznačeným resistantním místem k útoku esterázy (Gautam, 2007)**

Studii, které by se zabývaly tématem biodegradace polyetherových PURů je málo. V jednom z nedávných výzkumů se Matsumiya Y. zabývá houbou *Alternaria sp.* a její schopností degradovat polyetherový PUR. Z výzkumu vyplynulo, že degradace probíhá ve dvou krocích. Nejdříve houba proroste materiál a způsobí mechanické poškození a následně pomocí enzymů štěpí vazby v uretanové a močovinové skupině. Ve studii použili dva různé polyethery a v závislosti na metodě dosáhli až 40% degradace materiálu (Matsumiya et al., 2010).

#### **4. Charakteristika mikrobiálních společenstev**

Protože půdní bakterie a houby hrají stěžejní roli v biogeochemických pochodech, koloběhu živin a organických látek, je charakteristika půdních mikrobiálních společenstev považována za jeden z nejvíce citlivých ukazatelů kvality půd (van der Heijden et al., 1998). Různorodost mikrobiálních organismů souvisí s kvalitou půdy a přímo tak ovlivňuje nadzemní části ekosystémů včetně vegetace (O'Donnell et al., 2001; Kirk et al., 2004).

Půdní mikrobiální společenstva představují důležitou složku přírody, která nám umožní pochopit ekosystémovou dynamiku a dopady ekologických změn. Na rozdíl od rostlin nebo zvířat přináší mikrobiální měřítko možnost sledovat odezvy na změny v relativně krátkém časovém úseku a to i napříč mnoha generacemi mikroorganismů (Garland 1997). Je proto nezbytné mít přesnou a spolehlivou metodu ke studování půdních mikroorganismů, která bude nejspíše spočívat v kombinaci několika z mnoha dnes dostupných metod (Kirk et al., 2004).

#### 4.1. CLPP

Metoda CLPP byla vyvinutá počátkem 90. let Jayem Garlandem a Aaronem Millsem v americké Virginii. Je založená na vzniku barevného zabarvení po té, co bakterie metabolizují substrát s obsahem tetrazoliové soli (Garland, Mills 1991). Princip metody je následující:

Mikrotitrační destička s předem známými zdroji uhlíku, se inokuluje zkoumanou mikrobiální populací. U té se sleduje schopnost využívat rozdílné substráty a rychlost, s jakou tak činí. Vzniklou změnu barvy způsobenou úbytkem tetrazoliového barviva pak spektrofotometricky kvantifikujeme (Hill et al., 2000; Kirk et al., 2004).

Je důležité zohlednit následující skutečnosti:

- (1) Musíme mít standardizovanou počáteční hustotu inokula, protože ta ovlivňuje rychlost, s jakou se barvivo vytvoří.
- (2) Předpoklad, že změna barvy v každé jamce je znakem množství přítomných organismů ne vždy platí – některé organismy mohou být pouze více efektivní ve využívání daného substrátu, budou v jamce dominovat a vytvoří tak nerealistický obraz o jejich množství v původním vzorku.
- (3) Ne všechny substráty a zdroje uhlíku jsou ekologicky relevantní – z důvodu využívání metody i pro jiné než ekologické účely (Hill et al., 2000).

Tento postup označovaný jako BIOLOG, podle americké firmy, která ve spolupráci s Garlandem a Millsem začala jako první tyto mikrotitrační destičky vyrábět (Garland and Mills, 1991). Na stejném principu, ale s trochu rozdílným provedení funguje francouzský systém API, který místo mikrotitračních destiček používá pásky se známým zdrojem uhlíku (Kirk et al., 2004).

Zmíněné zdroje uhlíku mohou být různé látky od uhlovodíků (např. laktóza, mannitol aj.) přes aminokyseliny, aminy až po složité makromolekuly jako např. glykogen (Choi, Dobbs, 1999).

Tato metoda je velice flexibilní a můžeme s ní určovat mikrobiální společenstva z rozličných zdrojů např. kontaminované půdy, rostlinné rhizosféry nebo i samotná mikrobiální inokula.

Mezi nesporné výhody patří její jednoduchost a nenáročnost, takže můžeme provádět více vzorkování, než u jiných metod (Garland, 1997). Nevýhodami pak

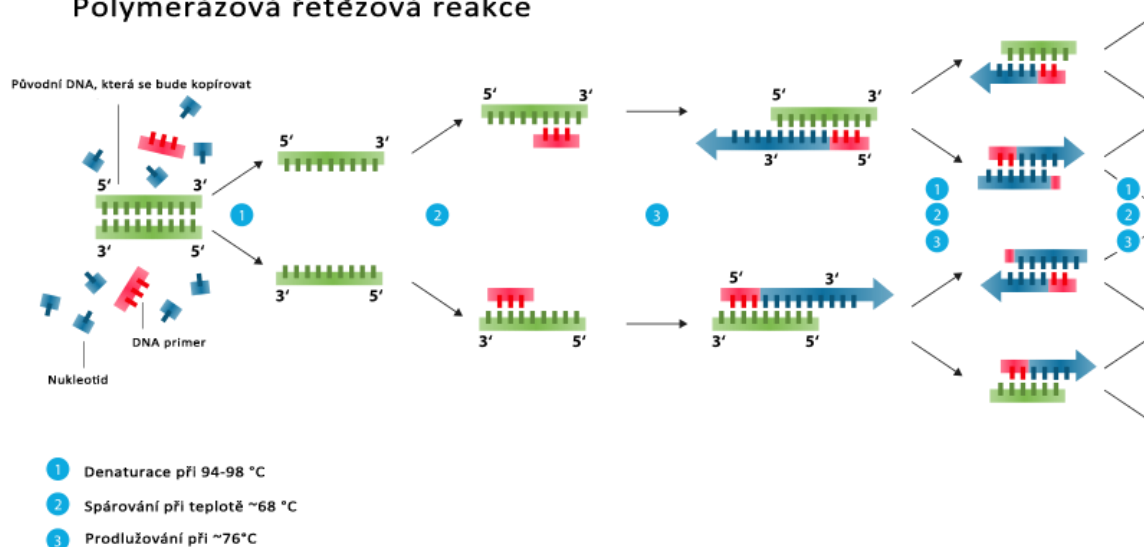
mohou být (1) fakt, že metoda favorizuje rychle rostoucí organismy, (2) odráží spíše teoretickou populaci v ideálních podmínkách a ne reálnou in-situ diverzitu a (3) její náchylnost na hustotu inokula (Kirk et al., 2004).

Metoda CLPP si své místo jako relativně jednoduchá, rychlá a levná nachází především v kvantitativní analýze, růstových trendech a vývinu mikroorganismů. Je žádoucí tuto metodu kombinovat s ostatními, kvalitativními analýzami, jako jsou DGGE nebo další a to proto, že tak dojde ke zpřesnění a zkompletování výsledků, které nám poměrně obecná metoda CLPP poskytne. (Hill et al., 2000; Kirk et al., 2004; Ros et al., 2008; Moretti, 2014; Allegrini et al., 2015)

#### **4.2. PCR**

PCR neboli polymerázová řetězová reakce, je postup používaný v molekulární biologii, při kterém dochází k množení části DNA. Výsledkem je námi zvolená sekvence DNA v počtu tisíců až milionů kopií. Metoda byla vyvinuta v USA v 80. letech minulého století a v roce 1993 za ní byla udělena Nobelova cena za chemii dvojici severoamerických vědců Kary Mullisovi a Michael Smithovi (NCBI.com). Principem metody je střídání tepelných cyklů, při kterých dochází k zahřívání a zchlazování reakce za účelem rozštěpení DNA a enzymatické replikaci. Vznikají tzv. primery, které obsahují sekvenci doplňující tu část DNA, kterou kopírujeme a DNA polymeráza – což je enzym, který vytváří DNA molekuly sestavováním nukleotidů. Během tohoto cyklu tepelných změn začne být vzniknuvší DNA sama použita jako substrát pro další replikaci a vzniká tak řetězová reakce (Roche.com).

## Polymerázová řetězová reakce



**Obr. 8 - Schéma Polymerázové řetězové reakce**

Samotná reakce má tři fáze: (1) denaturace DNA, (2) spárování komplementárních sekvencí, (3) prodlužování.

Pro použití v ekologii se nejčastěji kopíruje jeden z následujících segmentů: (1) 16S rDNA pro studium prokaryotních organismů nebo (2) 18S rDNA, ITS segmenty pro studium houbových komunit (Pace, 1997; Kirk et al., 2004).

### 4.2.1 PCR-DGGE a PCR-TGGE

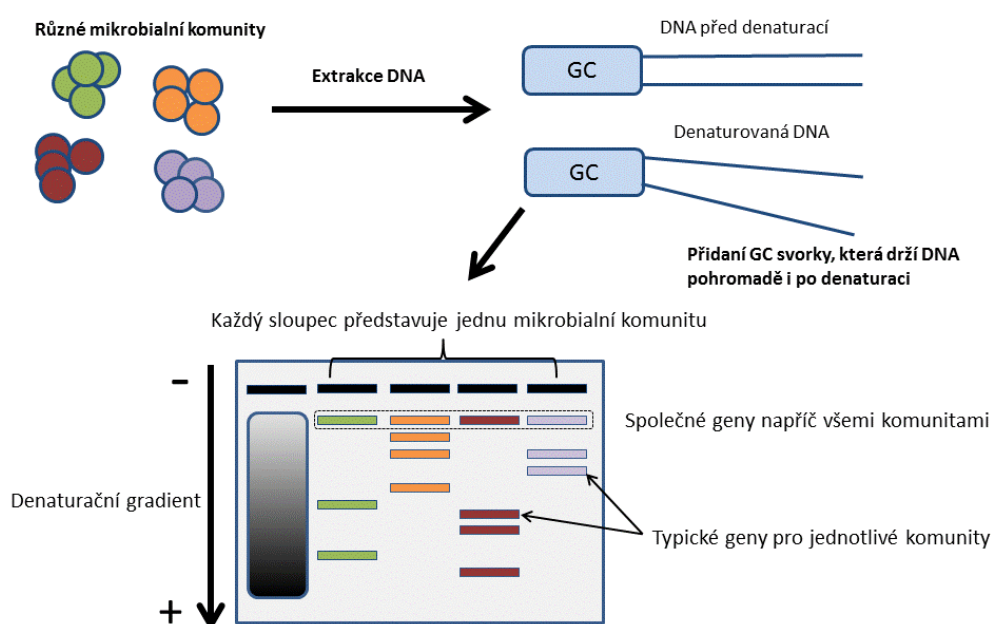
PCR-DGGE a PCR-TGGE jsou dvě podobné metody, které pracují s ribozomální DNA, po jejím namnožení. Principem obou metod je separace založená na elektroforetické pohyblivosti částečně štěpených dvoušroubovic DNA v polyakrylamidových gelech. Separace probíhá tak, že záporně nabitě molekuly DNA jsou nucené putovat gelem, dokud nenarazí na koncentraci denaturantů nebo teplotu, která je úplně rozštěpí (Diarrassouba, 2007). Po ukončení separace můžeme na různých místech v gelu pozorovat separované molekuly se specifickými sekvencemi DNA, podle kterých určíme o jaké společenstvo, nebo jeho část se jedná (Muyzer and Smalla, 1997). Nicméně je nezbytné dosáhnout pouze částečného štěpení a to proto, aby se separace v gelu řídila podle chování dvoušroubovice. Toho docílíme tak, že na 5' konec primeru nasadíme GC svorku, která udrží molekulu pohromadě (Muyzer and Smalla, 1997; Kirk et al., 2004;).

Před samotným zahájením analýzy je ovšem nutno zjistit ideální délku elektroforézy a štěpné chování našich DNA fragmentů. Oba tyto faktory zjistíme pomocí tzv. kolmé elektroforézy, kdy gradienty denaturantů nebo teploty jdou kolmo na pohyb elektroforézy. (Muyzer et al., 1993; Muyzer and Smalla, 1997).

Metody DGGE a TGGE se liší pouze způsobem štěpení molekul DNA.

DGGE – štěpí molekuly pomocí DNA denaturantu – směsí močoviny a formamidu, který se přidá do polyakrylamidového gelu v gradientu koncentrace.

TGGE – štěpí molekuly pouze gradientem teploty v gelu (Hill et al., 2000).



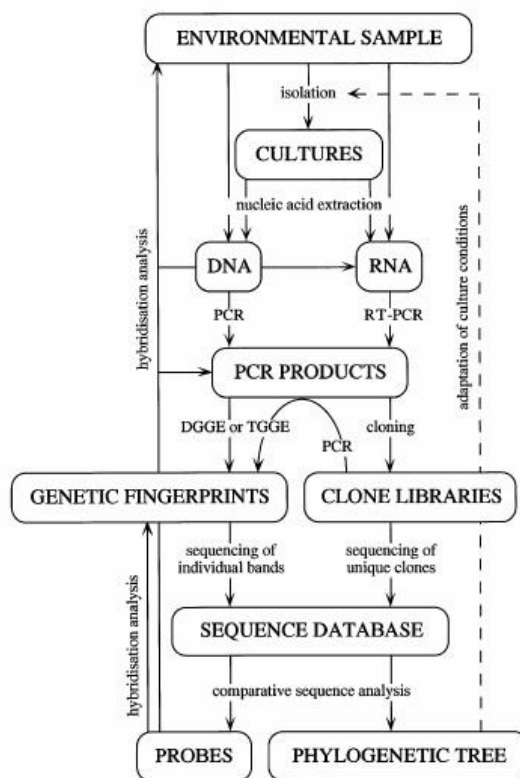
**Obr. 9 – Zjednodušený princip metody DGGE**

#### 4.2.2 Použití metod DGGE a TGGE

Obě metody omezuje fakt, že lze separovat pouze krátké fragmenty do 500 páru bází, což limituje množství informací pro další analýzy. Výhodou ovšem je, že jakékoliv mikroorganismy, které tvoří více, než 1% celkové komunity jsou těmito metodami detekovatelné (Muyzer and Smalla, 1997). Umožňují tak odhalit i druhy mikroorganismů, které jsou v nízkých počtech a proto se hodí k použití i na ekologicky zatížených lokalitách (Kirk et al., 2004).

Použití v ekologické praxi nachází tyto metody především v časových a prostorových

změnách bakteriálních společenstev nebo jako jedna z metod pro community fingerprinting. Užití ovšem nachází i např. v klinické mikrobiologii, kde se používají např. k odhalení variací sekvencí genů, které jsou spojované s nemocemi (Myuzer and Smalla, 1997).



**Obr. 10 – Graf postupu při použití DGGE/TGGE v environmentální analýze (Myuzer and Smalla, 1997)**

#### 4.3. PLFA

PLFA je v současnosti jednou z nepoužívanějších metod ke studiu mikrobiálních společenstev (Frosteegård et al., 2011) Spočívá v analýze fosfolipidových mastných kyselin, které se vyskytují v membránách živých buněk. Průběh této analýzy je následovný: (1) Uvolnění a extrakce fosfolipidů z membrán; (2) saponifikace fosfolipidů, která vyústí v uvolnění mastných kyselin; (3) instrumentální analýza těchto kyselin, nejčastěji metodou plynové chromatografie. Fakt, že se tyto fosfolipidy vyskytují v membránách, je důležitý zejména proto, že membrány se po smrti buňky rychle rozkládají a můžeme pozorovat právě živou biomasu mikroorganismů (Hill et al., 2000).

Membránové mastné kyseliny představují tzv. biomarkery a jako takové musí mít



několik vlastností. Především musí být taxonomicky specifické a musí rychle degradovat, aby byli schopné odrážet obraz o živé biomase. Některé studie sledují i cestu mikroorganismů trofickou kaskádou a pak je nezbytné, aby sledované mastné kyseliny nepodléhali žádným metabolickým změnám v těle konzumentů (Ruess and Chamberlain, 2010).

Fatty acid type	Frequently found	Lipid fraction	Predominant origin	Reference
<i>Saturated</i>				
>C20, straight	22:0, 24:0	PLFA, NLFA	Plants	Zelles (1999), Ruess et al. (2007)
Iso/anteiso methyl-branched	i, a in C14-C18	PLFA	Gram-positive bacteria	Zelles (1997, 1999)
10-methyl-branched	10ME in C15-C18	PLFA	Sulphate reducing bacteria	Dowling et al. (1986), Kerger et al. (1986)
Cyclopropyl ring	cy17:0, cy19:0	PLFA	Gram-negative bacteria	Zelles (1997, 1999)
Hydroxy substituted	OH in C10-C18	PLFA	Gram-negative bacteria Actinomycetes	Wakeham et al. (2003), Lee et al. (2004) Mirza et al. (1991)
<i>Monounsaturated</i>				
Double bond C5	16:1 $\omega$ 5	PLFA	AM fungi Bacteria	Olsson et al. (1995, 2003), Sakamoto et al. (2004) Nichols et al. (1986), Zelles (1997)
Double bond C7	16:1 $\omega$ 7 18:1 $\omega$ 7	NLFA PLFA PLFA	AM fungi Bacteria widespread Bacteria	Olsson et al. (1995, 2003), Madan et al. (2002) Guckert et al. (1991), Zelles (1999) Zelles (1999)
Double bond C8	18:1 $\omega$ 8	NLFA PLFA	AM fungi Methane-oxidising bacteria	Olsson (1999) Olsson (1999) Ringelberg et al. (1989)
Double bond C9	18:1 $\omega$ 9	PLFA PLFA PLFA, NLFA NLFA PLFA	Fungi Gram-positive bacteria Plants Nematodes AM fungi ( <i>Gigaspora</i> )	Bååth (2003), Vestal and White (1989) Zelles (1999) Harwood and Russell (1984), Ruess et al. (2007) Chen et al. (2001) Sakamoto et al. (2004)
<i>Polyunsaturated</i>				
$\omega$ 6 family	18:2 $\omega$ 6,9 18:3 $\omega$ 6,9,12 20:4 $\omega$ 6,9,12,15	PLFA NLFA PLFA, NLFA PLFA, NLFA	Fungi (saprophytic, EM) Animals Plants Zygomycetes Animals widespread	Frostegård and Bååth (1996), Zelles (1999) Ruess et al. (2000, 2005a), Haubert et al. (2006) Millar et al. (2000), Ruess et al. (2007) van der Westhuizen et al. (1994) Lechevalier and Lechevalier (1988), Stanley-Samuelson and Nelson (1993), Chen et al. (2001)
$\omega$ 3 family	18:3 $\omega$ 3,9,12 20:5 $\omega$ 3,6,9,12,15	PLFA PLFA, NLFA PLFA PLFA, NLFA	Higher fungi Plants Algae Collembola	Vestal and White (1989), van der Westhuizen et al. (1994) Weete (1980), Moore (1993) Lechevalier and Lechevalier (1988), Dunstan et al. (1994) Chamberlain and Black (2005)

**Obr. 11 – Vybrané mastné kyseliny a skupiny organismů, které představují (Ruess and Chamberlain, 2010)**

Při práci s touto metodou se musíme mít na pozoru zejména při interpretaci výsledků a chyb z toho plynoucích, kterých hrozí hned několik.

(1) Konkrétní mastná kyselina se může vyskytovat ve více organismech a může tak být relevantním indikátorem pouze v konkrétním prostředí nebo v kombinaci s jinou mastnou kyselinou.

(2) Při stresu - např. nedostatek potravy - mohou bakterie pozměnit svoji membránovou strukturu a komunita se tak dočasně může tvářit naprosto jinak.

(3) Ne vždy změna v množství nalezených mastných kyselin musí znamenat změnu v populaci. Například při nízkých teplotách je pomalejší degradace odumřelých membrán a může nám tak dávat falešnou informaci o reálné populaci v půdě. Nebo při kontaminaci půdy toxikantem, který zabije bakterie, ale zároveň zabrání rozkladu

membrán. Je tedy nutné na všechny tyto faktory brát ohled (Frosteegård et al., 2011). I přes tyto nedokonalosti má metoda PLFA nepochybně velkou relevanci na poli půdní mikrobiologie. A to díky kombinaci faktorů jako je rychlost, replikovatelnost, cena a statistická síla. Tyto faktory ji staví do pozice výchozí metody, která zjistí základní informace, na kterých mohou přesnější, náročnější a dražší metody stavět (Ramsey et al., 2006; Frosteegård et al., 2011).

Výstupem z této metody, kromě určení různých skupin mikroorganismů a jejich abundance, mohou být i ukazatele celkové mikrobiální biomasy a poměr hub a bakterií. Protože houby a bakterie vykonávají stejnou funkci v půdě – dekompozici organické hmoty – ale mají jiný C:N poměr je poměr hub a bakterií dobrým doplňujícím ukazatelem, který nám pomůže rozlišit jejich zastoupení (Bååth and Anderson, 2003).

## **5. Značené substráty**

Značenými substráty rozumíme nestandardní izotop prvku ve známé sloučenině, u kterého můžeme sledovat jeho putování např. v potravním řetězci, buněčných pochodech aj. (Wiechert et al., 2001). Umožní nám tedy sledovat nejen putování prvku samotného, ale i funkčních skupin, do kterých se mohl navázat (Evershed et al., 2006). V půdní ekologii se nejčastěji sleduje uhlík a jeho izotopy  $^{13}\text{C}$  a  $^{14}\text{C}$  (Hagedorn et al., 2015).

### **5.1. Přístupy ke značení**

Značený uhlík můžeme do našeho systému dostat několika běžně používanými způsoby. Ve formě substrátu např.  $^{13}\text{C}$  glukózy přidat do mikrokosmu a sledovat její putování. U rostlin můžeme využít obohaceného oxidu uhličitého, který se v procesu fotosyntézy dostane do jejich biomasy. A lze tak sledovat osud uhlíku nejen v rostlině, ale můžeme sledovat i její kořenové exudáty, které budou také bohaté na  $^{13}\text{C}$  uhlík. Metanotrofické bakterie můžeme podobně nechat vyrůst v přítomnosti  $^{13}\text{C}$  metanu (Evershed et al., 2006).

### **5.2. Použití v půdní ekologii**

V půdní ekologii má tento přístup význam zejména ve dvou okruzích: (1) zkoumání mikrobiálních komunit, kde jsou nejčastěji značeny lipidy, které později sledujeme

metodou PLFA (Evershed et al., 2006; Yao et al., 2014); (2) sledování osudu organických polutantů (např. polycyklických aromatických uhlovodíků) a jejich transformace v půdě (Richnow et al., 2001; Adam et al., 2015). Výstupy oproti neznačeným substrátům nám ukáží, které mikroorganismy se účastní biodegradace sledovaných látek a v jaké míře se tyto látky mineralizují, případně transformují do jiných forem.

Tohoto přístupu by se dle mého názoru, dalo s úspěchem využít i při zkoumání biodegradace plastů. Nicméně při mé literární rešerši jsem na takový výzkum nenarazil. Většinou se výzkumy týkají spíše jednodušších organických sloučenin, jako je toluen, antracen, pyren apod. (Richnow et al., 2001; Evershed et al., 2006; Adam et al., 2015), což bude nejspíš způsobeno velkou cenou značených surovin.

## **6. Praktická část**

### **6.1. Cíle práce**

#### **Podílí se esteráza na biodegradaci polyuretanů?**

Esteráza je enzym ze skupiny hydroláz, které jsou známé tím, že hydrolyticky štěpí estery na kyselinu a alkohol. Je zde tedy předpoklad, že se bude podílet na biodegradaci polyuretanu, který esterovou vazbu obsahuje. Největší aktivitu enzymu esterázy, tedy očekáváme u vzorku, který bude mít největší podíl biodegradace.

#### **Změní se složení mikrobiálního společenstva po biodegradaci polyuretanu?**

Během biodegradace polyuretanů vzniká velký počet látek a mezi nimi i některé škodlivé např. dietylen glykol. Je tedy otázkou do jaké míry bude tento a další produkty biodegradace ovlivňovat mikrobiální společenstvo.

Zároveň je zde ovšem předpoklad, že dodatečný materiál v podobě vzorku polyuretanu, bude sloužit jako zdroj živin pro mikroorganismy a očekáváme tak nárůst mikrobiální biomasy. U vzorku s nejvyšší biodegradací by mělo dojít k největšímu nárůstu.

### **6.2. Materiály**

#### **6.2.1 Půda**

Pro laboratorní experiment byla použita polní půda z okresu Praha – Západ sebraná na jaře 2015. Půda byla přeseta přes 2mm síto. Dále byly stanoveny její základní parametry jako pH, vodní kapacita, podíl sušiny, ztráta žíháním a poměr C:N.

Půda byla dále použita pro laboratorní test biodegradovatelnosti, který se řídil metodikou Standard Test Method for Determining Aerobic Biodegradation in Soil of Plastic Materials or Residual Plastic Materials After Composting (D 5988; ASTM International, PA, United States).

Pro každý materiál byly připraveny dvě paralely a byly uloženy do termoboxu o teplotě 21 °C. Každý týden byly láhve otevřeny a provedlo se měření postupu biodegradace (Tošovská, 2016). Experiment probíhal pět měsíců a vzorky na mikrobiální analýzu se odebrali po třech měsících a po jeho ukončení.

### **6.2.2 Testované materiály**

Byly testovány vzorky čtyř nových polyuretanů (A, B, C, D) u kterých byl předpoklad pro jejich biodegradabilitu. Jako kontrola sloužil vzorek konvenčního (K) polyuretanu a celulóza.

## **6.3. Metody**

### **6.3.1 Stanovení základních parametrů půdy**

#### **pH**

Stanovení pH probíhalo dle normy ISO 10390, kdy se použije 1 díl půdy na 5 dílů vody a tato suspenze se nechá třepat po dobu 1 hodiny. Poté se nechá hodinu usadit a změří se pH.

#### **Vodní kapacita**

Vodní kapacita se stanovovala následujícím způsobem: 1 díl vysušené půdy se zalil 2 díly vody a nechal se přes noc stát. Druhý den se vzorek po dobu 3 hodin nechal vykapávat a z této vykapané půdy se stanovila sušina. Měření mělo tři opakování.

#### **Stanovení sušiny**

Sušina se stanovila ve třech opakováních. Navážená půda se nechala sušit v sušárně při teplotě 105 °C po dobu 8 hodin. Půda se dále dosušovala další hodinu na konstantní hmotnost. Z rozdílu navážky, před a po sušení, se stanovila sušina.

#### **Ztráta žíháním**

Ztráta žíháním se stanovila z vysušené půdy tak, že se navážka nechala žíhat po dobu 5 hodin při teplotě 550 °C. Ztráta žíháním se stanovila z rozdílu navážky před a po žíhání.

#### **Poměr C:N**

Poměr C:N se stanovoval CHNOS analyzátozem EA 1108 (Carlo Erba Instruments, Itálie).

### **6.3.2 Stanovení fosfolipidových mastných kyselin**

#### **Extrakce lipidů**

Byl navážen 1 g lyofilizované půdy do vypálené zkumavky. Ke vzorku se přidalo 0,5 ml fosfátového pufru (50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 1,25 ml metanolu a 0,625 ml chloroformu. Vzorek se uzavřel víčkem a byl po dobu půl minuty vortexován. Následně se nechal hodinu při laboratorní teplotě ve tmě extrahovat.

Po jedné hodině, následovala centrifugace (3500 rpm, 5 minut). Supernatant se odebral Pausterovou pipetou do vypálené zkumavky a uchoval ve tmě. K sedimentu

se opět přidalo 1,25 ml metanolu a 0,625 ml chloroformu a vzorek byl vortexován a ponechán hodinu extrahovat za stejných podmínek. Opět následovala centrifugace (3500 rpm, 5 minut) a supernatant se odtáhl a spojil s předešlým. Extrakce chloroformem a metanolem proběhla identicky ještě jednou. K celkovému supernatantu se přidalo 1,9 ml fosfátového pufru a 1,9 ml chloroformu. Směs se zvortexovala a ponechala přes noc, při teplotě 4 °C.

Druhý den se znovu provedla centrifugace (3500 rpm, 5 minut) a Pausterovou pipetou se odebrala spodní chloroformová část do vypálené vialky. Vodná fáze se znovu extrahovala a spodní chloroformová část se spojila s předchozí.

### **Frakcionace lipidů**

Získaný extrakt z minulého kroku se odpařil pod dusíkem a rozpustil v 300 µl chloroformu. Kolonka Lichlorut Si 60 (Merk, 200 mg, No. 1.020221.0001) se promyla 1,5 ml chloroformu a byl na ní nanesen vzorek. Postupně byl vzorek promýván 2 ml chloroformu (neutrální lipidy), 6 ml acetonu (glykolipidy) a 2 ml metanolu (fosfolipidy). První dvě frakce se nechaly vytéct a jímala se až třetí fosfolipidová frakce.

### **Mírná alkalická metanolýza (transesterifikace)**

Získaná fosfolipidová frakce z minulého kroku se odpařila pod dusíkem. K odparku se přidalo 0,5 ml toluenu a 0,5 ml metanolu a směs se zvortexovala. Ke vzorku byl přidán 1 ml 0,2 M KOH v bezvodém metanolu a inkuboval se po dobu 15 minut při teplotě 37 °C ve vodní lázni. Ke vzorku bylo přidáno 1,6 ml hexanu, 0,4 ml chloroformu, 0,3 ml 1 M kyseliny octové a 2 ml destilované vody, směs se vortexovala a centrifugovala (2500 rpm, 7 minut).

Horní hexanová fáze se Pausterovou pipetou přenesla do vypálené vialky. Tato extrakce byla opakována za stejných podmínek ještě dvakrát a všechny tři horní fáze se spojily a byly odpařeny dusíkem. Odparek se rozpustil v 950 µl hexanu pomocí vortexu a celý objem byl přenesen do krimpovací vialky. Bylo přidáno 50 µl vnitřního standardu (C13:0 v hexanu o koncentraci 200 ppm). Vialku jsme uzavřeli krimpovacími kleštěmi. Následovala analýza plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (GC-MS).

### 6.3.3 Poměr hub a bakterií

Poměr hub a bakterií byl vypočten z dat získaných z analýzy mastných kyselin.

$$F/B = \frac{\text{Fungal biomass } [\mu\text{g/ml}]}{\Sigma(\text{Bacteria, G+}, \text{G-}, \text{Actinobacteria,}) [\mu\text{g/ml}]}$$

Jedná se tedy o podíl celkové houbové biomasy, celkovou biomasou bakterií, kde G+ a G- představují gram-pozitivní a gram-negativní bakterie.

### 6.3.4 Stanovení esterázy

#### Princip metody

Metoda je založena na spektrofotometrickém stanovení látky methylumbellyferol (MUF), která má fluoreskující vlastnosti. Vlastní reakce probíhá na mikrotitrační destičce, kde se k homogenizovanému vzorku přidá methylumbellyferolacetát. Ten reaguje v přítomnosti esterázy (kterou produkuje mikrobiální společenstvo) a rozpadá se na fluoreskující MUF.

#### Stanovení

Byl navážen 1g vzorku půdy a k němu přidáno 100 ml octanového pufru (50 mM, pH = 5,0). Směs se homogenizovala v mixéru a vzorky byly přelity do 100 ml Erlenmeyerových baňek. Vzorky byly za stálého promíchávání pipetovány na destičku.

Do jamek pro stanovení aktivity bylo pipetováno 200  $\mu\text{l}$  homogenizovaného vzorku a 40  $\mu\text{l}$  substrátu (1,25 mM 4-methylumbellyferyl-acetát v DMSO). Do jamek určených ke kalibraci bylo pipetováno 200  $\mu\text{l}$  homogenizovaného vzorku a 40  $\mu\text{l}$  standardu o různé koncentraci (0,0025 - 1,25 mM methylumbellyferol v DMSO).

Takto připravená destička se přikrytá nechala temperovat ve spektrofotometru Infinite M200 PRO (Tecan, Švýcarsko). Fluorescence se měřila po 125-ti minutách při excitační vlnové délce 365 nm a emisní vlnové délce 445 nm.

## 7. Výsledky a diskuze

### 7.1. Charakteristika půdy

Vodní kapacita původní půdy byla stanovena na 34.3% a sušina na 90.5%. Ostatní charakteristiky jsou uvedené v tabulce. Řádek kontrola představuje půdu bez testovaného materiálu.

**Tab. 2 – Vybrané charakteristiky experimentální půdy**

Půda	pH	C [%]	N [%]	Ztráta žiháním [%]	Poměr C:N
Původní půda	6,64±0,14	2,00±0,07	0,15±0,02	6,60±0,06	13,85±1,72
Kontrola	6,18±0,07	2,20±0,01	0,20±0,00	6,53±0,03	10,90±0,00
Celulóza	6,32±0,06	2,18±0,01	0,20±0,01	6,52±0,41	10,75±0,10
PUR – A	6,21±0,04	2,16±0,03	0,20±0,00	6,55±0,15	10,95±0,45
PUR – B	6,26±0,00	2,10±0,02	0,20±0,02	6,77±0,11	10,40±1,20
PUR – C	6,28±N/A	2,15±0,07	0,22±0,00	6,49±0,12	9,95±0,05
PUR – D	6,25±0,05	2,11±0,02	0,19±0,00	6,72±0,15	11,00±0,20
PUR – K	6,22±0,06	2,09±0,00	0,20±0,00	6,61±0,02	10,55±0,25

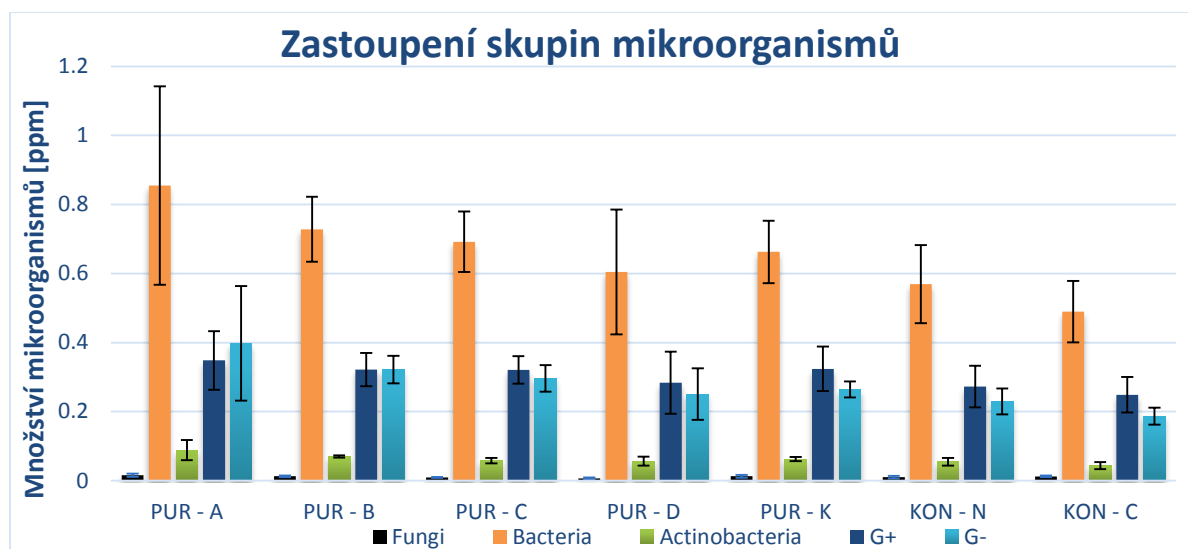
Použitá polní půda představuje velice průměrnou půdu v našich podmínkách. Jedná se tedy o ekologicky relevantní prostředí, především pokud uvažíme, že zemědělské aplikace jsou v současnosti jedny z hlavních užití biodegradovatelných plastů.

### 7.2. PLFA

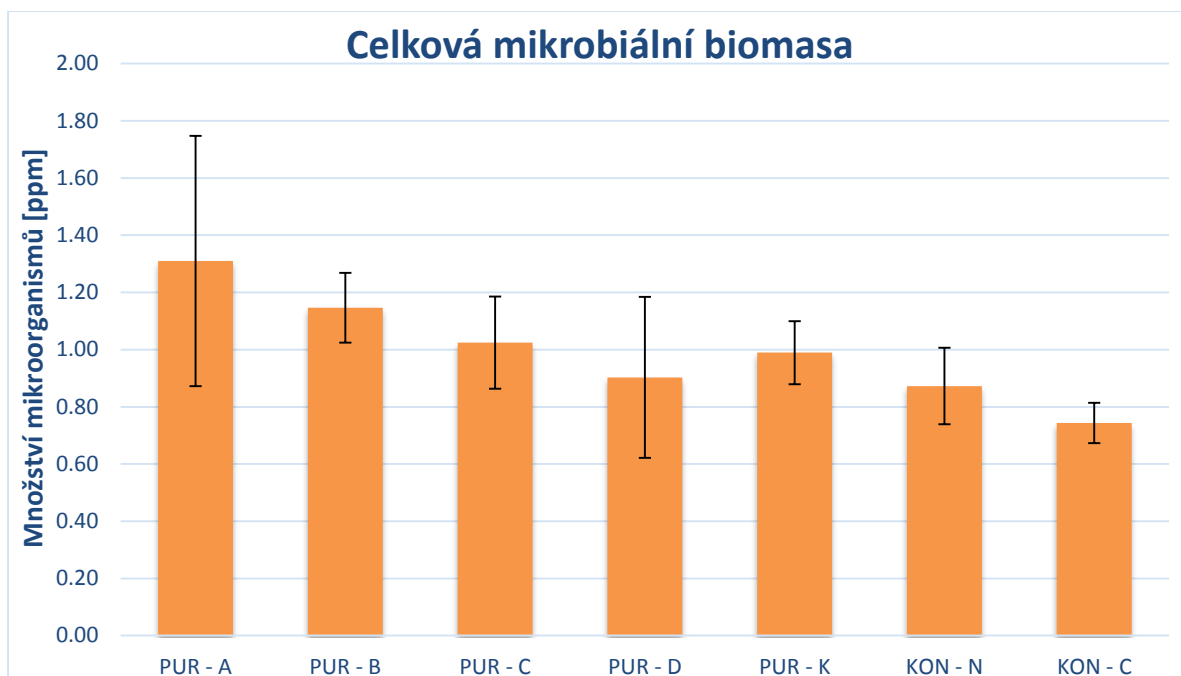
Analýza mastných kyselin proběhla po třech měsících biodegradačního experimentu. Ze zmíněné PLFA analýzy naší půdy a výpočtu poměru mezi houbami a bakteriemi jsme zjistili, že naše půda obsahuje minimum houbové biomasy (Bååth and Anderson, 2003); to si vysvětlujeme tím, že půda pochází z pole a pravděpodobně dochází k opakovanému poškozování houbových mycelií. Toto zjištění by mohlo do určité míry vysvětlit nízké hodnoty biodegradace polyuretanů, protože na základě literární rešerše očekáváme největší biodegradaci právě od hub (Darby and Kaplan, 1968; Cosgrove et al., 2007; Lucas et al., 2008; Mastumiya et al., 2010; Bhardwaj et al., 2013). Zastoupení různých skupin mikroorganismů se statisticky nelišilo (ANOVA,



F= 0,826,  $p>0,05$ ,) mezi půdami, kde degradovali. Lze tak usoudit, že biodegradace nemá na složení společenstva vliv.

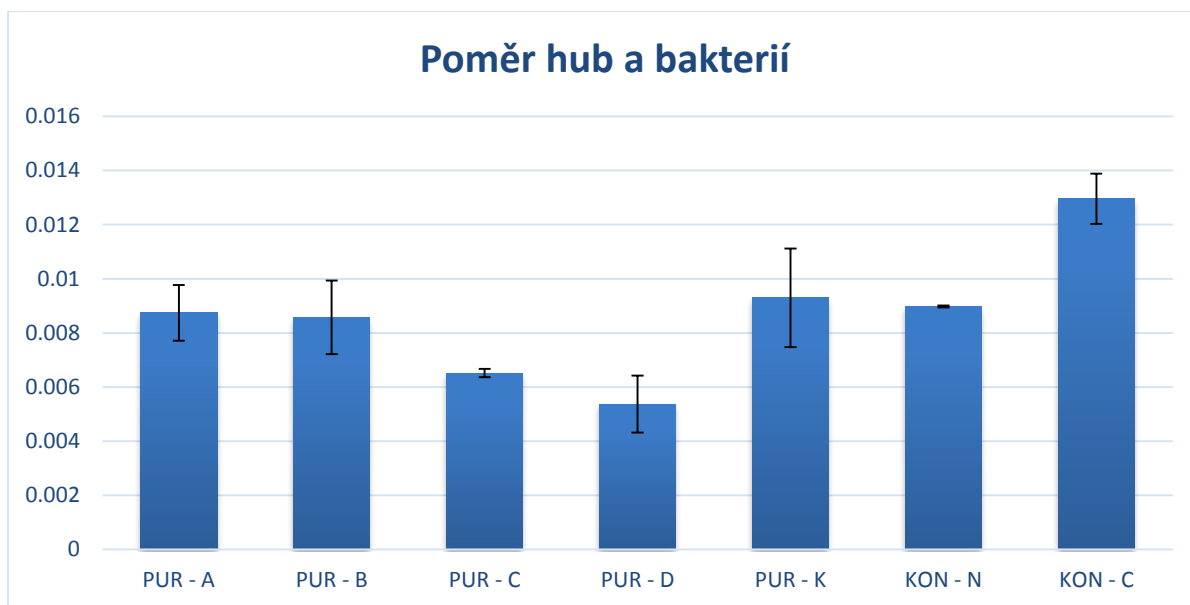


**Obr. 12 – Zastoupení různých skupin mikroorganismů v půdě z mikrokosmů, ve kterých probíhal biodegradační pokus s těmito materiály: jednotlivé potencionálně biodegradovatelné polyuretany (PUR – A, B, C, a D); konvenční polyuretan (PUR – K); kontrola v podobě celulózy (KON – C) a v půdě bez přítomnosti materiálu (KON – N). Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka stanovení (2 paralely).**



**Obr. 13 – Celková mikrobiální biomasa v půdě z mikrokosmů, ve kterých probíhal biodegradační pokus s těmito materiály: jednotlivé potencionálně biodegradovatelné polyuretany (PUR – A, B, C, a D); konvenční polyuretan (PUR – K); kontrola v podobě celulózy (KON – C) a v půdě bez přítomnosti materiálu (KON – N). Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka stanovení (2 paralely).**

Na základě biodegradačního experimentu, při kterém nejvyššího stupně mineralizace dosáhl materiál PUR-B (Tošovská, 2016) jsme očekávali i největší nárůst biomasy u tohoto materiálu. Nicméně změna v celkové mikrobiální biomase na Obr 13. se neprokázala statisticky signifikantně (ANOVA,  $F = 1,031$ ,  $p > 0,05$ ). Lze tak usoudit, že biodegradace polyuretanů nemá na mikrobiální společenstvo pozitivní vliv.

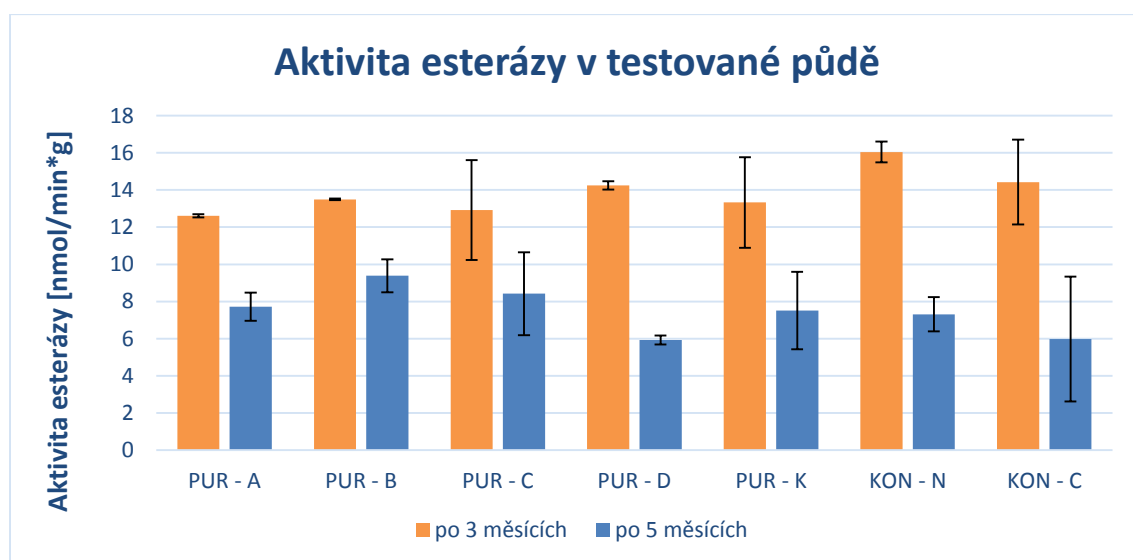


**Obr. 14 – Poměr hub a bakterií v půdě z mikrokosmů, ve kterých probíhal biodegradační pokus s těmito materiály: jednotlivé potencionálně biodegradovatelné polyuretany (PUR – A, B, C, a D); konvenční polyuretan (PUR – K); kontrola v podobě celulózy (KON – C) a v půdě bez přítomnosti materiálu (KON – N). Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka stanovení (2 paralely).**

Houby by se měly biodegradace materiálu účastnit nejvíce, což by znamenalo, že u materiálu PUR-B (který dosáhl nejvyššího stupně mineralizace (Tošovská, 2016)) by měl poměr hub a bakterií být nejvyšší. Z grafu je patrné, že tomu tak není a spolu s výsledky z celkové mikrobiální biomasy lze usoudit, že mikroorganismy nepoužily materiál polyuretanu pro růst své biomasy.

### 7.3. Esteráza

Protože u materiálu PUR – B docházelo k největší biodegradaci (Tošovská, 2016) očekávala se i největší aktivita enzymu esterázy, která se podílí na hydrolytickém štěpení (Eubeler et al., 2010). Nicméně z experimentálních hodnot nám vyšlo, že nebyla signifikantně (ANOVA,  $F = 1,591$ ,  $p > 0,05$ ) vyšší než u ostatních materiálů. Velké rozdíly po 3 a 5 měsících si vysvětlujeme tím, že po 3 měsících se stále nacházíme v růstové fázi mikrobiální komunity, ale po 5 měsících jsme již ve fázi úpadku.



**Obr. 15 – Aktivita enzymu esterázy v půdě z mikrokosmů, ve kterých probíhal biodegradační pokus s těmito materiály: jednotlivé potencionálně biodegradovatelné polyuretany (PUR – A, B, C, a D); konvenční polyuretan (PUR – K); kontrola v podobě celulózy (KON – C) a v půdě bez přítomnosti materiálu (KON – N). Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka stanovení (2 paralely).**

## 8. Závěr

Biodegradabilní plasty představují do budoucna velmi perspektivní materiál, který je v současnosti, i přes mediální obraz, spíše ve fázi vědeckého vývoje. Vyráběné plasty s pro-oxidanty a jinými aditivy, které jsou prezentované jako (bio)degradabilní, představují značné environmentální riziko. Dynamika procesu biodegradace polymerních materiálů v půdě ještě stále není zcela pochopena a je žádoucí, aby byla dále prozkoumána. Cílem této práce bylo přispět k pochopení některých mechanismů spojených s biodegradací polyuretanů, což jsou jedny z nejpoužívanějších plastů současnosti, v ekologicky relevantním prostředí polní půdy.

Metodou analýzy mastných kyselin (PLFA) bylo sledováno, zda biodegradace polyuretanů v půdě bude mít významný negativní nebo pozitivní vliv na skladbu a abundanci mikrobiálních organismů v prostředí polní půdy. V naší půdě jsme nepozorovali ani pozitivní ani negativní vliv biodegradace polymerů na tyto faktory. Z literatury vyplývá, že skupina, která se biodegradace účastní nejvíce, jsou především houby a těch naše půda obsahovala minimum, do budoucna by tedy bylo vhodné použít jinou půdu např. lesní. Ani rozdíl v celkové mikrobiální biomase, se neprokázal signifikantní, lze předpokládat, že biodegradace polyuretanů nemá negativní vliv na půdní mikroorganismy.

V další části práce, bylo sledováno, zda se na enzym esteráza podílí na biodegradaci polyuretanů. Očekávali jsme nárůst aktivity enzymu spolu s mírou biodegradace materiálu. Nicméně materiál, který degradoval nejvíce, nevykazoval vyšší míru aktivity esterázy. Lze tedy usoudit, že se esteráza během našeho experimentu na biodegradaci polyuretanů nepodílela.

## Literatura

- Adam, I.K.U., Miltner, A. & Kästner, M., 2015. Degradation of <sup>13</sup>C-labeled pyrene in soil-compost mixtures and fertilized soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(22), pp.9813–9824.
- Andrady, A.L., 2011. Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 62(8), pp.1596–1605.
- Arutchelvi, J. et al., 2008. Biodegradation of polyethylene and polypropylene. *Indian Journal of Biotechnology*, 7(1), pp.9–22.
- Bååth, E. & Anderson, T.H., 2003. Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(7), pp.955–963.
- Beech, I.B., Sunner, J.A. & Hiraoka, K., 2005. Microbe-surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. *International Microbiology*, 8(3), pp.157–168.
- Bhardwaj, H., Gupta, R. & Tiwari, A., 2013. Communities of Microbial Enzymes Associated with Biodegradation of Plastics. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(2), pp.575–579.
- Choi, K.H. & Dobbs, F.C., 1999. Comparison of two kinds of Biolog microplates (GN and ECO) in their ability to distinguish among aquatic microbial communities. *Journal of Microbiological Methods*, 36(3), pp.203–213.
- Clements, A. et al., 2010. The essential chemical industry. *Chemical Industry Education Centre, University of York*. ISBN 978 1 85342 595 0. Dostupné z www: <http://www.essentialchemicalindustry.org/index.php>
- Cosgrove, L. et al., 2007. Fungal communities associated with degradation of polyester polyurethane in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(18), pp.5817–5824.
- Darby, R.T. & Kaplan, a M., 1968. Fungal susceptibility of polyurethanes. *Applied microbiology*, 16(6), pp.900–905.
- Diarrassouba, 2007. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE): An overview. [Online, cit. 5.4.2016] Dostupné z www: <http://www.scq.ubc.ca/denaturing-gradient-gel-electrophoresis-dgge-an-overview/>
- Eubeler, J.P., Bernhard, M. & Knepper, T.P., 2010. Environmental biodegradation of synthetic polymers II. Biodegradation of different polymer groups. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 29(1), pp.84–100.

- Evershed, R.P. et al., 2006.  $^{13}\text{C}$ -Labelling of lipids to investigate microbial communities in the environment. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(1), pp.72–82.
- Flemming, H. & Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nature reviews. Microbiology*, 8(9), pp.623–33.
- Frostegård, Å., Tunlid, A. & Bååth, E., 2011. Use and misuse of PLFA measurements in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(8), pp.1621–1625.
- Garland, J. & Mills, a L., 1991. Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities Based on Patterns of Community-level Sole Carbon-source Utilization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(8), pp.2351–2359.
- Garland, J. L., 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, 24(4), pp.289–300.
- Garlotta, D., 2002. A Literature Review of Poly (Lactic Acid). *Journal of Polymers and the Environment*, 9(2), pp.63–84.
- Gautam, R., Bassi, A. S. & Yanful, E.K., 2007. A Review of Biodegradation of Synthetic Plastic and Foams. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 141(2), pp.85–108.
- Gu, J.D., 2007. Microbial colonization of polymeric materials for space applications and mechanisms of biodeterioration: A review. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 59(3 SPEC. ISS.), pp.170–179.
- Hagedorn, F. et al., 2015. Tracking litter-derived dissolved organic matter along a soil chronosequence using  $^{14}\text{C}$  imaging: Biodegradation, physico-chemical retention or preferential flow? *Soil Biology and Biochemistry*, 88, pp.333–343.
- Hill, G.T. et al., 2000. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*, 15(1), pp.25–36.
- Horák, P., 2012. Využití obnovitelných a recyklovatelných surovin pro přípravu nových polymerních materiálů. Univerzita Karlova v Praze. Diplomová práce
- Howard, G.T., Ruiz, C. & Hilliard, N.P., 1999. Growth of *Pseudomonas chlororaphis* on a polyester-polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-esterase enzyme. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 43(1-2), pp.7–12.
- Howard, G.T., 2002. Biodegradation of polyurethane: A review. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 49(4), pp.245–252.

Howard, G.T., Norton, W.N. & Burks, T., 2012. Growth of *Acinetobacter gernerii* P7 on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase enzyme. *Biodegradation*, 23(4), pp.561–573.

Kirk, J.L. et al., 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58(2), pp.169–188.

Kubista, M. et al., 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2-3), pp.95–125.

Loredo-Treviño, A. et al., 2012. Microbial Enzymes Involved in Polyurethane Biodegradation: A Review. *Journal of Polymers and the Environment*, 20(1), pp.258–265.

Lucas, N. et al., 2008. Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques - A review. *Chemosphere*, 73(4), pp.429–442.

Lunt, J., 1998. Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. *Polymer Degradation and Stability*, 59(1-3), pp.145–152.

Matsumiya, Y. et al., 2010. Isolation and characterization of an ether-type polyurethane-degrading micro-organism and analysis of degradation mechanism by *Alternaria* sp. *Journal of Applied Microbiology*, 108(6), pp.1946–1953.

McMurry, J. 2004. Organic Chemistry, Sixth Edition, Brooks/Cole, a Thomson Learning Company, Stamford, Connecticut, US. ISBN: 0534389996

Moretti, G. et al., 2015. Microbial community distribution and genetic analysis in a sludge active treatment for a complex industrial wastewater: a study using microbiological and molecular analysis and principal component analysis. *Annals of Microbiology*, pp.397–405.

Muyzer, G Uitterlinden AG, de Waal EC, Uitterlinden AG, D.W.E.C., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), pp.695–700.

Muyzer, G. & Smalla, K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(1), pp.127–41.

NCBI.com. Polymerase chain reaction (PCR). [cit. 11.5.2016] dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>

O'Donnell, A.G. et al., 2001. Plants and fertilisers as drivers of change in microbial community structure and function in soils. *Plant and Soil*, 232(1-2), pp.135–145.



Pace, N.R., 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science*, 276(5313), pp.734–740.

PackagingEurope, 2008. [cit. 9.5.2016] dostupné z: <http://www.packagingeurope.com/Packaging-Europe-News/24683/PLA-bottles-soon-to-be-released-in-Italy.html>

Pethrick, R.A., 2010. Polymer Science and Technology for Engineers and Scientists. *Wiley, Hoboken, New Jersey*. ISBN: 0470600179

PlasticsEurope, 2015. Plastics – the Facts 2014/2015: An analysis of European plastic production, demand and waste data. [cit. 23.4.2016] dostupné z: [http://www.plasticseurope.org/documents/document/20150227150049-final\\_plastics\\_the\\_facts\\_2014\\_2015\\_260215.pdf](http://www.plasticseurope.org/documents/document/20150227150049-final_plastics_the_facts_2014_2015_260215.pdf)

Ramsey, P.W. et al., 2006. Choice of methods for soil microbial community analysis: PLFA maximizes power compared to CLPP and PCR-based approaches. *Pedobiologia*, 50(3), pp.275–280.

Reddy, C.S.K. et al., 2003. Polyhydroxyalkanoates: An overview. *Bioresource Technology*, 87(2), pp.137–146.

Richnow, H.H. et al., 1998. The use of <sup>13</sup>C-labelled polycyclic aromatic hydrocarbons for the analysis of their transformation in soil. *Chemosphere*, 36(10), pp.2211–2224.

Roche.com. PCR: How we copy DNA. [cit. 11.5.2016] dostupné z: <http://molecular.roche.com/pcr/Pages/Process.aspx>

Ros, M. et al., 2008. 16S rDNA analysis reveals low microbial diversity in community level physiological profile assays. *Journal of Microbiological Methods*, 72(3), pp.221–226.

Ruess, L. & Chamberlain, P.M., 2010. The fat that matters: Soil food web analysis using fatty acids and their carbon stable isotope signature. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(11), pp.1898–1910.

Shah, A.A. et al., 2008. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 26(3), pp.246–265.

Štípal Z., Aneznbacher P., Peč P., Pospíšil J., Růžička I., 1992. Biochemie. Státní pedagogické nakladatelství, Praha. ISBN:8004217362

Tokiwa, Y. et al., 2009. Biodegradability of plastics. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(9), pp.3722–3742.

Tošovská K., 2016. Stanovení biologické rozložitelnosti nových typů lehčených polyurethanů. Univerzita Karlova v Praze. Bakalářská práce

Urgun-Demirtas, M., Singh, D. & Pagilla, K., 2007. Laboratory investigation of biodegradability of a polyurethane foam under anaerobic conditions. *Polymer Degradation and Stability*, 92(8), pp.1599–1610.

van der Heijden, M.G.A. et al., 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature*, 396(6706), pp.69–72.

Vert, M. et al., 2012. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry*, 84(2), p.1.

Widmer, F. et al., 2001. Assessing soil biological characteristics: A comparison of bulk soil community DNA-, PLFA-, and biolog<sup>TM</sup>-analyses. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(7-8), pp.1029–1036.

Wiechert, W. et al., 2001. A Universal Framework for ... Metabolic Flux Analysis. *Metabolic engineering*, 3(3), pp.265–283.

Yao, H. et al., 2015. <sup>13</sup>C PLFAs: a key to open the soil microbial black box? *Plant and Soil*, 392(1-2), pp.3–15.